

沙棘提取物对癌细胞 DNA、蛋白质合成及体内血浆中的 cAMP 含量的影响

李 忌¹, 王肖萱², 郑荣梁²

(1. 厦门大学抗癌中心, 福建 厦门 361000; 2. 兰州大学生物学系, 甘肃 兰州 730000)

摘 要: 采用同位素示踪技术和蛋白质结合法研究了沙棘汁和沙棘油的抗癌机理, 结果显示: 沙棘汁对 L₇₇₁₂ 白血病、S₁₈₀ 肉瘤、腹水型肝癌等细胞的 DNA、蛋白质合成均无抑制作用。沙棘油浓度在 0.005 mg/L ~ 1.0 mg/L 时对 L₇₇₁₂ 白血病细胞 DNA 合成有抑制作用, 且此时抑制率与浓度呈负相关。沙棘汁 ip 注射剂量为 1/5 LD₅₀ 时, 沙棘汁对小鼠血浆 cAMP 含量略有提高。

关键词: 沙棘果汁; 沙棘种子油; L₇₇₁₂ 白血病细胞; S₁₈₀ 肉瘤; 腹水型肝癌; DNA; 蛋白质; cAMP
中图分类号: S793.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-8809(2008)01-0008-03

沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) 含有多种天然生物活性物质^[1], 有很强的杀菌、止痛及促进组织再生作用。沙棘油是一种珍贵的药用油, 对四氯化碳性肝损伤有保护作用^[2]。20 世纪 50 年代苏联保健卫生部就已将沙棘油用于治疗放射损伤及大面积烧伤。国内张培珍等对沙棘汁和沙棘油的抗癌活性进行了较系统研究^[4], 发现沙棘油浓度 1.69 g/kg 体重时对 S₁₈₀ 肉瘤生长抑制率达 42.7%, 对 B₁₆ 黑色素瘤抑制率达 40.7%; 沙棘汁浓度为 0.94 g/kg 体重时对 P₃₈₈ 淋巴细胞白血病细胞抑制率达 36.6%, 对 B₁₆ 抑制率为 42.4%。而就沙棘汁和油的抗癌机理, 目前尚未见报道。

本工作采用同位素示踪技术和蛋白质结合法研究了沙棘汁和油对体外培养的癌细胞 DNA 和蛋白质合成及对小鼠血浆中的 cAMP 含量的影响。

1 材料与方法

沙棘汁和油 均由兰州制药厂药物研究所提供, 沙棘汁系沙棘果经压榨、过滤、浓缩所得^[4]; 沙棘油系沙棘种子用石油醚提取而成^[2]。二者均为新鲜提制; 在无菌条件下, 沙棘汁用 20% 丙二醇, 沙棘油用 0.2% 二甲亚砜 (DMSO) 配制成所需浓度。

实验动物: 昆明种小鼠 (20 ± 2 g, SPE 级), 雌雄各半; 615 纯系小鼠 (15 ± 2 g, SPE 级), 雌雄各半, 均由兰州生物制品研究所实验动物室提供。

培养液: RPMI1640 培养液 (日本株式会社产

品), MEDUM199 培养液 (美国 GIBCO 产品), 二者均含有 10% 小牛血清、青霉素 1.0 × 10⁵ U/L 链霉素 100 mg/L。

癌细胞: 取无菌接种 d₅ 的 615 小鼠的 L₇₇₁₂ 白血病细胞 (上海药物所引种), 或昆明种小鼠的 S₁₈₀ 和腹水型肝癌 (AH) 细胞 (甘肃省肿瘤所引种), 用生理盐水洗涤一次, 计数配成所需的细胞悬液。

同位素标记物: ³H - TdR (比度 999 GBq/mmol), ³H - Leu (2.967 GBq/mmol), 均由上海原子能所供。

消化剂: HClO₄ H₂O₂ = 1 : 1 (v/v)

闪烁液: 0.5% PPO 和 0.01% POPOP 的二甲苯溶液与无水乙醇 6 : 4 (v/v)。cAMP 分析药盒 (中国科学院原子能研究所产品)。

沙棘汁对癌细胞 DNA 和蛋白质合成的测定: 用 RPMI1640 培养液配成 3 × 10⁵ 个/ml 的各种癌细胞悬液, 分别每瓶分装 4.8 ml, 37 °C 温育 14 h 后随机分组, 加入不同剂量沙棘汁, 对照组加相应量的溶剂。同时, 每瓶加 0.1 ml 的 ³H - TdR 或 ³H - Leu 使细胞培养液放射性强度为 1.0 × 10⁻³ Ci/L, 继续温育 48 h 后, 离心收获细胞。用生理盐水洗涤 3 次, 将未标记上的同位素洗去, 然后, 消化细胞, 用闪烁液将消化物转移到测量杯, 置 FJ - 2100 型自动液体闪烁仪测放射性, 比较对照组与各剂量组的平均 cpm 值。

沙棘油对 L₇₇₁₂ 白血病细胞 DNA 合成的测定: 用 MEDIUM199 培养液配成 2 × 10⁵ 个/ml 细胞悬

收稿日期: 2007-11-12

医药研发

液,分装、培养、标记、测量等方法同前。

沙棘汁对小鼠血浆 cAMP 含量影响的测定:选昆明种小鼠 18 只(20 ±2g),随机分为两组。实验组 ip 注射沙棘汁溶液[1.88 g/ (kg ·d) 给 5 d],对照组 ip 注射相应剂量的溶剂。停药后隔天眼底抽血,将 3 只小鼠的血浆放在同一管内混匀,每管 2 个重复,用蛋白质结合法^[5] (cAMP 分析药盒)测定 cAMP 含量,共 6 个重复。

2 结果与讨论

2.1 沙棘汁对癌细胞 DNA 和蛋白质合成的影响

DNA 是细胞遗传的基本物质。许多抗癌药物是通过阻断 DNA 等生物大分子物质的合成而导致细胞死亡。TdR 是 DNA 合成特需前身物,细胞的增殖速率与³H - TdR 参入 DNA 的速率基本一致^[5],所以,它的参入率可以反映细胞 DNA 合成及增殖力。³H - Leu 是蛋白质合成的特需前身物,其参入率反映细胞代谢活力。不同剂量沙棘汁对三种癌细胞 DNA 和蛋白质合成,从统计学处理结果看均无显著性差异(表 1 和表 2)。

表 1 沙棘汁对癌细胞 DNA 合成的影响			
瘤株	药物浓度 (mg/L)	³ H - TdR 参入量 (10 ⁵ cpm)	P
L ₇₇₁₂	0	5.6 ±1.4	
	50	5.4 ±1.1	>0.1
	100	5.6 ±2.7	>0.1
	150	5.3 ±1.8	>0.1
S ₁₈₀	0	4.9 ±2.0	
	50	5.0 ±2.6	>0.1
	100	5.2 ±1.7	>0.1
	150	4.8 ±2.2	>0.1
AH	0	5.2 ±1.2	
	50	5.1 ±2.1	>0.1
	100	5.0 ±1.7	>0.1
	150	5.3 ±2.3	>0.1

一般认为抗癌药 ID₅₀ 在 1~100 mg/L 为有效^[6],本实验中沙棘剂量已高达 150 mg/L,说明沙棘汁作为抗癌药,不是直接抑制癌细胞 DNA 和蛋白质合成过程,而可能是一种生物效应调节剂,即通过改善宿主对癌细胞的生物效应而产生抗癌作用^[7]。

2.2 沙棘油对 L₇₇₁₂ 白血病细胞 DNA 合成的影响

L₇₇₁₂ 细胞药敏性高于 S₁₈₀ 及 AH 细胞^[8],沙棘油(0.005~1.0 mg/L)对 L₇₇₁₂ 白血病细胞 DNA 合成有抑制作用,且抑制率随沙棘油剂量的增加有降低的趋势,这与沙棘油成分复杂有关。可能是其中的抗癌因素与非抗癌因素之间存在某种拮抗作用;不同剂量范围内,这两种因素作用对象表现出的优势不同(表 3)。

表 2 沙棘汁对癌细胞蛋白质合成的影响			
瘤株	药物浓度 (mg/L)	³ H - TdR 参入量 (10 ⁵ cpm)	P
L ₇₇₁₂	0	2.3 ±0.9	
	50	2.2 ±1.0	>0.1
	100	2.3 ±0.5	>0.1
	150	2.4 ±1.2	>0.1
S ₁₈₀	0	3.2 ±0.7	
	50	3.4 ±0.9	>0.1
	100	3.1 ±0.6	>0.1
	150	3.3 ±0.5	>0.1
AH	0	3.6 ±0.8	
	50	3.8 ±0.7	>0.1
	100	3.7 ±0.5	>0.1
	150	3.9 ±1.0	>0.1

2.3 沙棘汁对小鼠血浆 cAMP 含量的影响

cAMP 是生物体的细胞生理生化代谢的重要调节因子,它是激素的第二(或第三)信使。提高 cAMP 的含量有防止细胞癌变或抑制其分裂的作用^[9]。

本实验用 1/5 LD₅₀ [1.88 g/ (kg ·d) 给 5 d]沙棘汁 ip 注射小鼠时,小鼠血浆中 cAMP 含量略有提高(见表 4)。可见,沙棘汁的抗癌活性与 cAMP 代谢途径有关,另一方面,它还可能通过提高巨噬细胞吞噬能力和淋巴细胞转化能力来增强细胞免疫功能以抑制癌细胞生长^[10]。

表 3 沙棘油对 L ₇₇₁₂ 白血病细胞 DNA 合成的影响			
药物浓度 (mg/L)	³ H - TdR 参入量 (10 ⁵ cpm)	抑制率 (%)	P
0	5.0 ±0.2		
0.005	2.6 ±0.1	48.0	<0.05
0.010	2.7 ±0.3	46.0	<0.05
0.100	3.0 ±0.5	40.0	<0.05
1.000	3.8 ±0.4	24.0	<0.05

表 4 沙棘汁对小鼠血浆 cAMP 含量的影响

	cAMP(nmol/L)	百分率(%)	P
对照组	42.5 ±1.5		
实验组	45.0 ±2.0	106	<0.05

总之,沙棘汁和沙棘油均含有丰富的天然活性物质^[4],各种物质可通过不同的代谢途径对生物机体起调节作用。本文可为进一步研究沙棘的药理活性及开发利用沙棘资源提供参考。

参 考 文 献

[1] 葛孝炎等.沙棘化学成分的研究概况[J].中草药,1986,12(8):42~44.

[2] 赵天德等.沙棘油对四氯化碳性肝损伤的保护作用[J].中草药,1987,13(11):22~26.

[3] Zhang P Z et al. Antitumor effect of fruit juice of *Hippophae rhamnoides* and its influence on immune function[J]. Cancer Semother Pharmacol. ,1991 ,23 :28 ~ 30.

[4] 乔太生等.沙棘果的营养成分[J].营养学报,1988,10(2):168~172.

[5] 刘力生等.联苯双脂对癌细胞 DNA、RNA、蛋白质、体内血浆中 cAMP 代谢和细胞免疫功能的影响[J].兰州大学学报(自然科学学版),1985,21:42~47.

[6] Michael A et al. Comparative biochemistry of hepatomas VI. Thymidine incorporation into DNA as measure of hepatoma growth rate[J]. Cancer Res. ,1966 ,24 :464 ~ 468.

[7] Charles G et al. An improved tissue assay I. Methodology and cytotoxicity of antitumor agents[J]. Cancer Res. ,1959,19:843~846.

[8] 张能芳.恶性肿瘤防治药物概况[J].药学进展,1999,13(1):1~6.

[9] 郑升等.可移植物小白鼠白血病模型(L₇₇₁₂)的初步研究[J].肿瘤,1982,2:6~9.

[10] 金大年等.沙棘种籽油和沙棘浓缩汁对小鼠免疫功能的影响[J].甘肃药学,1988,3(2):10~12.

重 要 声 明

1.《沙棘》季刊系经原国家科委批准、国内外创办最早的关于沙棘属植物资源建设与保护、优良品种选育与推广、综合开发利用与新产品研发以及沙棘新医药研发的学术性与技术性相结合的科技期刊(国内外公开发行)。本刊以报道国内外沙棘学术(技术)研究、产品研发、产业建设,新技术、新动态、新经验、新成果为宗旨,竭诚为国内外相关专业学者、科技人员、管理工作、相关专业大专院校师生和沙棘开发企业生产厂商服务,欢迎有关各界人士投稿、订阅、刊登广告、发布相关信息和研究成果,共同促进我国及世界沙棘开发利用事业的健康发展。

2.凡为本刊撰写、翻译、绘制、拍摄的文稿、图片等,从发表之日起,其专有出版权一律归《沙棘》杂志编辑部所有。欲转载本刊有关文稿、图片、资料等,须事先征得本刊编辑部的书面同意,并在适当位置注明出处。

3.本刊实行文章作者及广告主体文责自负的原则,其观点不代表本刊。对其侵犯他人版权或其他权益的文字、图片、广告等,本刊编辑部不承担任何连带责任。

《沙棘》杂志编辑部